

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22420071150876

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

壬基酚和雌二醇对中华乌塘鳢
性腺发育和精子活力的影响

Effects of Nonylphenol and Estradiol on Gonad
Development and Sperm Motility in Chinese Black Sleeper
Bostrichthys sinensis

左 明 杰

指导教师姓名: 洪 万 树 教 授

专 业 名 称: 海 洋 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 05 月

论文答辩时间: 2010 年 05 月

2010 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 绪论.....	5
1 环境内分泌干扰物研究进展.....	5
1.1 环境内分泌干扰物.....	5
1.2 环境内分泌干扰物的种类及来源.....	5
1.3 环境内分泌干扰物的危害.....	7
1.4 环境内分泌干扰物对机体的作用机制.....	8
2 壬基酚和雌二醇概述.....	9
2.1 壬基酚的结构及性质.....	9
2.2 壬基酚的生产和应用.....	10
2.3 壬基酚的环境分布.....	11
2.4 壬基酚的毒性效应.....	11
2.5 雌二醇概述.....	14
3 中华乌塘鳢的研究进展.....	15
3.1 生物学特征及生态习性.....	15
3.2 胚胎、仔稚鱼发育及早期性腺发育研究.....	16
3.3 养殖中华乌塘鳢的雌雄同体现象.....	17
4 计算机辅助精子分析.....	17
5 研究的目的是和意义.....	19
第二章 壬基酚和雌二醇对幼鱼性腺发育及性分化的影响.....	21
1 材料与方法.....	21
1.1 实验用鱼及日常饲养管理.....	21
1.2 主要试剂及仪器.....	21
1.3 暴露方法.....	22
1.4 组织学研究.....	23
1.5 数据处理及统计分析.....	24

2 实验结果	24
2.1 暴露50天实验结果	24
2.2 暴露100天实验结果	26
3 讨论	31
3.1 环境内分泌干扰物对幼鱼生长的影响	31
3.2 环境内分泌干扰物对幼鱼性腺发育及性分化的影响	32
第三章 壬基酚和雌二醇对雄鱼精子发生及活力的影响	34
1 材料与方法	34
1.1 实验用鱼及日常饲养管理	34
1.2 主要试剂及仪器	34
1.3 暴露方法	35
1.4 取样观察	35
1.5 数据的统计分析	35
2 实验结果	36
2.1 壬基酚和雌二醇对性腺指数的影响	36
2.2 壬基酚和雌二醇对精子发生的影响	36
2.3 壬基酚和雌二醇对精子活力的影响	37
3 讨论	40
3.1 环境内分泌干扰物对鱼类性腺指数的影响	40
3.2 环境内分泌干扰物对鱼类精子发生的影响	40
3.3 环境内分泌干扰物对雄鱼雌雄同体性腺的诱导	41
3.4 环境内分泌干扰物对鱼类精子活力的影响	41
3.5 环境内分泌干扰物对鱼类精子发生及活力影响的可能机制	42
3.6 壬基酚的生物毒性	43
结论与展望	44
特色与创新	46
参考文献	47
硕士研究生期间发表的论文	61

参加的科研项目	61
---------------	----

致谢	62
----------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Chinese abstract	1
English abstract.....	3
Chapter 1 Introduction.....	5
1 Advances in the study on EDCs.....	5
1.1 EDCs.....	5
1.2 The types and sources of EDCs.....	5
1.3 The harms of EDCs.....	7
1.4 The mechanism of EDCs on the body.....	8
2 Nonylphenol and estradiol overview.....	9
2.1 Structure and character of nonylphenol.....	9
2.2 Production and application of nonylphenol.....	10
2.3 The environmental distribution of nonylphenol.....	11
2.4 Toxic effects of nonylphenol.....	11
2.5 Estradiol overview.....	14
3 Progresses in the studies of <i>Bostrichthys sinensis</i>.....	15
3.1 Biological characteristics and habits.....	15
3.2 Research of embryonic, larval development and early gonadal development.....	16
3.3 Hermaphroditism in cultured chinese black sleeper.....	17
4 Computer-aided sperm analysis.....	17
5 Purpose and significance of the research.....	19
 Chapter 2 The effects of nonylphenol and estradiol on gonad development and sexual differentiation of the larval.....	 21
1 Materials and methods.....	21
1.1 Experimental fish and daily feeding and management	21
1.2 Main reagents and equipment.....	21

1.3 Exposure method.....	22
1.4 Histological study.....	23
1.5 Data processing and analysis.....	24
2 Results.....	24
2.1 Results of 50 days exposure.....	24
2.2 Results of 100 days exposure.....	26
3 Discussion.....	31
3.1 Effects of EDCs on larval growth.....	31
3.2 Effects of nonylphenol and estradiol on gonad development and larval sexual differentiation.....	32
Chapter 3 Effects of nonylphenol and estradiol on spermatogenesis and sperm motility in the male.....	34
1 Materials and methods.....	34
1.1 Experimental fish and daily feeding and management	34
1.2 Main reagents and equipment.....	34
1.3 Exposure method.....	35
1.4 sampling and observation.....	35
1.5 Statistical analysis.....	35
2 Results.....	36
2.1 Effects of nonylphenol and estradiol on the gonadosomatic index.....	36
2.2 Effects of nonylphenol and estradiol on the spermatogenesis.....	36
2.3 Effects of nonylphenol and estradiol on the sperm motility.....	37
3 Discussion.....	40
3.1 Effects of EDCs on gonadosomatic index of fish.....	40
3.2 Effects of EDCs on fish spermatogenesis.....	40
3.3 Induction of hermaphrodite gonad in mature male fish by EDCs.....	41
3.4 Effects of EDCs on sperm motility of fish.....	41
3.5 Possible mechanism of EDCs affecting spermatogenesis and sperm motility in fish.....	42
3.6 Biological toxicity of nonylphenol.....	43
Conclusions and prospects.....	44

Characteristics and innovation	46
References	47
Publications during study	61
Research grants	61
Acknowledgements	62

摘 要

本文以中华乌塘鳢 (*Bostrichthys sinensis* Lacépède) 为研究对象, 以壬基酚 (4-nonylphenol, NP) 和雌二醇 (17β -estradiol, E_2) 为环境内分泌干扰物的代表, 从幼鱼和成鱼两个层次上研究其对中华乌塘鳢性分化、幼鱼性腺发育以及对雄鱼精子发生和精子活力的影响, 探讨养殖中华乌塘鳢雌雄同体产生的诱因及其作为水环境污染的指示生物的可行性, 为发展鱼类健康养殖和环境保护提供科学依据。

在幼鱼暴露阶段, 将 30 日龄的幼鱼暴露于 1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 3 个质量浓度的 NP 和 10 $\mu\text{g/L}$ E_2 中, 同时设空白对照组和溶剂对照组, 采用半静水式暴露体系, 持续暴露 100 d。分别于暴露 50 d (即 80 日龄) 和 100 d (即 130 日龄) 时取样观察, 测量体重和体长, 以组织学方法观察性腺发育情况, 统计性别比例。研究表明, 暴露 100 d 后, 3 个 NP 暴露组的体重和体长随暴露浓度的升高呈上升趋势, 且 100 $\mu\text{g/L}$ NP 组的体重和体长与溶剂对照组相比差异显著 ($p<0.05$), 其原因可能是在一定浓度以下 (如 100 $\mu\text{g/L}$), NP 对中华乌塘鳢幼鱼的生长有促进作用, 而且随着浓度的升高, 这种促进作用逐步增强; 而 10 $\mu\text{g/L}$ E_2 组的体重和体长与溶剂对照组相比并无显著性差异 ($p>0.05$)。在性腺发育方面, NP 暴露组的性腺发育相对滞后, 性腺结构出现一定程度的损伤; E_2 暴露组的性腺发育也受到一定程度的抑制和损伤, 而且发现大量畸形卵巢。在性别比例方面, NP 暴露组在两次采样中均未发现性别比例的改变; E_2 组在暴露 50 d 采样时雌鱼比例虽然较高, 但与溶剂对照组相比差异却不够显著 ($p>0.05$), 而在 100 d 采样时雌鱼比例却高达 89%, 与溶剂对照组相比差异极显著 ($p<0.01$), 这说明雌激素效应的发挥需要一定的暴露时间。

在成鱼暴露阶段, 同样采用半静水式暴露体系, 在中华乌塘鳢的繁殖季节选取性成熟雄鱼暴露于 1、10、100、1000 $\mu\text{g/L}$ 4 个质量浓度的 NP 和 10 $\mu\text{g/L}$ E_2 中, 同时设空白对照组和溶剂对照组。暴露 28 d 后, 运用计算机辅助精子分析 (CASA) 系统测定精子活力, 以组织学方法观察精巢结构 (1000 $\mu\text{g/L}$ NP 组暴露 14 d)。研究表明, 较高浓度 NP (100 $\mu\text{g/L}$) 暴露不仅使中华乌塘鳢精巢

性成熟度明显降低并出现纤维化现象,同时也使其精子活率和精子运动速率显著降低 ($p<0.01$)。1000 $\mu\text{g/L}$ NP 组的雄鱼暴露 14 d 后精巢组织发生解体,精子几乎不具运动能力,暴露 16 d 后全部死亡,说明 NP 对中华乌塘鳢具有较强的生理毒性。10 $\mu\text{g/L}$ E₂ 组的雄鱼精巢结构并无明显损伤,也未发现雌雄同体性腺,但精子活力与溶剂对照组相比却显著降低 ($p<0.01$),这表明精子活力对环境内分泌干扰物的反应较为敏感。

关键词: 中华乌塘鳢 壬基酚 雌二醇 性分化 性腺发育 精子活力

Abstract

In this paper, we used 4-nonylphenol (NP) and 17 β -estradiol (E₂) as endocrine disrupting chemicals to study their effects on sex differentiation and gonad development of the young fish and on spermatogenesis and sperm motility of mature male fish in Chinese black sleepers (*Bostrichthys sinensis* Lacépède). Both the mechanisms of hermaphroditic occurrence and feasibility that this species could be used as a bioindicator for water pollution were discussed. The results of the study are available for the fish healthy culture and environmental protection.

30-day-old Chinese black sleepers were exposed to NP at 3 concentrations (1, 10, and 100 $\mu\text{g/L}$) and 10 $\mu\text{g/L}$ E₂ for 100 days in a semi-static water exposure system. Blank and solvent were served as negative control. The weight and body length were measured, histological method was used to observe the gonad development and the sex ratio was also obtained after 50 and 100 days of exposure. The results showed that the body weights and lengths increased with the increases of experimental concentrations after 100 days of exposure to NP in the three treatment groups, with a significant increase ($p < 0.05$) at the highest concentration group. This suggested that NP at a certain concentration could promote the growth of juvenile fish, and that the promotion is strengthened with the increases of concentration. However, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the 10 $\mu\text{g/L}$ E₂ exposure group and the control group. The gonad development lagged and gonad structure was damaged after exposure to NP. The gonad development was inhibited and a large number of abnormal ovaries were found in the E₂ exposure groups. Exposure to NP did not affect the sex ratio in the treatment groups. Although the proportion of female fish was higher ($p > 0.05$) than that of control after 50 days of E₂ exposure, the proportion of female reached 89% ($p < 0.01$) after 100 days of E₂ exposure. This suggested that the effect of E₂ on sex ratio needs time.

Sexually mature male Chinese black sleepers were exposed to NP at 4

concentrations (1, 10, 100 and 1000 µg/L) and 10 µg/L E₂ in a semi-static water exposure system during the breeding season. Blank and solvent groups were served as negative control. Computer-aided sperm analysis (CASA) system was applied to measure the sperm motility and histological method was used to observe the testicular structure after 28 days of exposure (1000 µg/L NP exposed for 14 days). The results showed that exposure to 100 µg/L NP obviously reduced the degree of testicular maturity and caused fibrosis of testicular tissues. The activation rates and velocity of sperms also decreased significantly ($p<0.01$). After 14 days of exposure to 1000 µg/L NP, disorganization of testis was observed and motile sperms were hardly found. No fish survived after 16 days of exposure to 1000 µg/L NP, suggesting that the NP has greatly physiological toxicity to sperms. Testicular structural damage and hermaphroditic gonads were hardly found after exposure to 10 µg/L E₂. Meanwhile, sperm motility decreased significantly compared with the control, indicating that sperms were sensitive to environmental endocrine disrupting chemicals.

Key words: *Bostrichthys sinensis*; nonylphenol; estradiol; sex differentiation; gonad development; sperm motility

第一章 绪论

1 环境内分泌干扰物研究进展

1.1 环境内分泌干扰物

环境内分泌干扰物（Endocrine disrupting chemicals, 简称EDCs）是指可干扰生物体内保持自身平衡、调节发育过程的内分泌激素的合成、分泌、运输、结合和代谢等过程的外源性化学物质^[1]。

EDCs在环境中分布广泛，并可通过食物链及其他途径进入动物和人体内，干扰机体正常内分泌物质的合成与代谢，激活或抑制内分泌系统功能，对人类、家畜、野生动物的生命和繁殖带来不可低估的危害^[2]。对EDCs污染问题的认知、研究与防治已经得到了全球的重视：1995年美国联邦政府委托国家科学技术委员会（NSTC）制定EDCs的研究战略；日本环境厅于1998年公布了EDCs战略计划；欧盟委员会1999年制定了研究的短、中、长期计划^[3]。在我国，对EDCs的研究尚处于起步阶段，亟需加强这方面的研究。

1.2 环境内分泌干扰物的种类及来源

EDCs 广泛存在于环境中，依据 EDCs 作用功能可分为环境雌激素、环境雄激素、环境甲状腺激素等。根据其来源、化学结构又可分为^[4]（表 1.1）：（1）天然雌激素：如雌二醇（estradiol, E_2 ）、雌酮（estrone）、雌三醇（estriol）。据报道成熟女性雌激素产生量分别为：雌二醇 0.5~5 $\mu\text{g/d}$ ，雌酮 3~20 $\mu\text{g/d}$ ，雌三醇最高，达 64 $\mu\text{g/d}$ 。它们在肝脏中经过氧化、羟基化、还原和甲基化作用代谢成无活性的极性结合物排泄到环境中，环境中的微生物可将无活性物质分解成有活性的雌激素再释放到环境中。（2）植物、真菌性雌激素：许多植物中含有具有内分泌干扰活性的物质，其本身或代谢物具有与雌激素受体（ER）结合产生弱雌激素活性的效能。人类食物中植物性雌激素主要存在于豆科植物中，如大豆含丰富的异黄酮，豆芽中含丰富的拟雌内酯。另外在种子和干果中植物激素含量也很高。真菌性雌激素主要是指由真菌产生的具有类雌激素活性的物质，如 2,4-二羟基苯甲酸内酯，这类物质经常污染谷物和玉米，从而进入人和野生动物体内产生内分

泌干扰作用。(3) 人工合成的雌激素：最常见的人工合成雌激素是 17- α 炔雌醇 (EE₂)，它是避孕药的主要成分之一，体外实验和雌激素活性实验均证明 EE₂ 具有极强的雌激素活性。(4) 环境化学污染物：随着工农业的发展，人们发现越来越多的工农业原料、中间品和成品都有内分泌干扰活性。如工业生产中产生的内分泌干扰物如塑料增塑剂邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 和邻苯二甲酸二正丁酯 (DBP)、去污剂和洗涤剂中的表面活性剂烷基酚聚氧乙烯醚 (APEs) 等，这些物质在水体、底泥和水生生物体内都可检测到。很多农药和杀虫剂也具有内分泌干扰活性，据 2000 年数据统计，我国农药年施用量达 50 多万吨，其中 80% 直接进入环境，对环境造成了不可估量的损害。另外还有些没有任何实际用途的环境持久性有机物，如二噁英和多氯联苯等也具有内分泌干扰活性。(5) 重金属类：如铅、镉、汞等，此类物质在环境中无法降解，因此其环境雌激素效应亦不容忽视。

表 1.1 环境内分泌干扰物的种类及主要来源^[1,4]

Tab.1.1 The types and main sources of endocrine disrupting chemicals

分类	代表物质	主要来源
天然雌激素	雌二醇、雌酮、雌三醇	生物体内细胞分泌
植物、真菌性雌激素	异黄酮、二氢黄酮、黄酮醇、香豆素、木脂素、异黄酮类、香豆雌酚	豆科植物和环境中霉菌毒素
人工合成雌激素	乙烯雌酚、乙烷雌酚、炔雌醇、炔雌醚	口服避孕药或促进家畜生长的同化激素
环境化学污染物	烷基酚类：壬基酚、辛基酚、双酚 A 多环芳香烃 (PAHs)：苯并(a)芘 多氯联苯类 (PCBs) 有机氯杀虫剂和除草剂：DDT、拟除虫菊酯、麦草畏、阿特拉津 五氯酚、三丁基锡、三苯基锡 邻苯二甲酸酯类 (PAEs) 二噁英类：2,3,7,8-TCDD	塑料增塑剂、乳化剂、漂洗剂、环氧树脂、聚丙烯酸酯 煤焦油 绝缘材料 合成农药 防腐剂 聚乙烯塑料的增塑剂和软化剂、合成橡胶、润滑油的添加剂等 有机氯化工生产的副产品、城市固体废物燃烧、纸浆漂白过程
重金属类	铅、镉、汞等	工矿企业排污、农药和化肥的施用等

1.3 环境内分泌干扰物的危害

EDCs 对生物体的影响是多方面的, 目前的研究主要集中于生殖系统、神经系统、免疫系统等方面。(1) 对生殖系统的影响: EDCs 引起体内性激素代谢的变化, 对依赖性激素的生理过程特别是生殖产生严重影响, 主要表现为生殖器和性腺形态功能异常, 甚至出现雌雄同体现象, 精子和卵子质量和数量下降及前列腺功能改变, 导致生殖机能失常等。如 Guillette 等(1995)发现, 1980 年美国佛罗里达州 Apopka 湖的严重农药污染使得短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)数量明显减少, 雌性短吻鳄卵巢有多排卵小囊, 许多卵母细胞都是多核的。雄性动物输精管结构发育异常, 一些胚芽细胞清楚地显现出了有丝分裂的形状; 同时还发现该地区动物的生殖器尺寸远小于来自其它地方的同类^[5]。Sone 等(2005)用 1 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 群勃龙(trenbolone)暴露雌性食蚊鱼(*Gambusia affinis*)幼鱼 28 d 后, 发现雌鱼体内出现雌雄同体性腺, 卵巢中出现精子^[6]。Hirai 等(2006)将日本青鳉(*Oryzias latipes*)从受精卵开始暴露于 150 ng/L E_2 , 直至性成熟, 结果发现所有受暴露个体均发生了性别反转, 转变为功能性雌鱼, 并表现出明显的雌性第二性征^[7]。Lahnsteiner 等(2005)将河鲈(*Salmo trutta f.fario*)暴露于双酚 A (BPA) 的实验证明, BPA 不仅可以延迟其繁殖高峰期, 而且可以降低其精子活率和运动速率^[8]。(2) 对神经系统的影响: EDCs 能影响神经细胞的活动及神经系统的传导能力, 从而造成神经系统发育延迟、智力损伤及神经行为的变化。毒死蜱(O,O-二乙基-O-硫代磷酸酯)和甲氧滴滴涕(MXC)能影响下丘脑细胞系中促性腺素释放素的基因表达和生物合成。毒死蜱还可引起神经轴突膨大, MXC 可引起神经轴突收缩, 提示二者可能影响到神经元的活动^[9]。Suzuki 等(2003)将孕期小鼠和新生小鼠暴露在 BPA 中, 其子代与新生小鼠脑中多巴胺 D1 受体的水平明显升高, 依赖多巴胺 D1 受体的奖赏效应增强, 并使多巴胺 D1 受体对边缘前脑(imbic forebrain)的 G 蛋白产生正调节作用。提示其能增强中枢神经系统中依赖多巴胺 D1 受体的神经传导能力^[10]。(3) 对免疫系统的影响: 相关研究显示 EDCs 可能有改变机体免疫功能和增加自身免疫性的作用。人类接触多氯联苯、二噁英、己烯雌酚、有机氯农药等可影响机体免疫功能, 表现为或亢进或抑制。生理浓度的雌激素可提高机体免疫力, 剂量较大时则增加自身免疫性疾病的易感性^[11]。实验显示, 小鼠经雌激素处理后, 体内 T 细胞功能减退, 而 B 细胞功能亢进, 淋巴器官中淋巴细胞减少, 从而引起 B 细胞介导的自身免疫性

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库